道衛研所報 Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health, 59, 67-71 (2009)

腸管出血性大腸菌 O157 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動システム（PFGE）と IS-printing system の比較検討

Comparison of Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) and IS-printing System for Analysis of *Escherichia coli* O157

清水　俊一　　森本　洋　　駒込　理佳　　山口　敬治

Shunichi SHIMIZU, Yo MORIMOTO, Rika KOMAGOME and Keiji YAMAGUCHI

Key words：IS-printing system（IS プリンティング）；Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)（パルスフィールドゲル電気泳動）；*Escherichia coli* O157（大腸菌 O157）

食中毒事件発生時に行う疫学調査は，食品由来感染症の拡大を防ぐと共に，再発防止のために大変重要なものである．近年，腸管出血性大腸菌 O157 やカンピロバクターなど，原因菌の分子疫学的分析が感染源究明に利用され，その有用性が報告されている[1]．その中でパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法は，特に優れた分子疫学的解析法であり，国立感染症研究所を中心にデータベースの構築が進んでいる[2]．しかしながら，PFGE による分子疫学的分析は高額な PFGE 装置が必要であり，菌の分離後，プラグの作成，制限酵素処理，電気泳動を行わなければならず，迅速性に欠ける問題点がある．

このようななか腸管出血性大腸菌 O157 について，PCR ベースで遺伝子型別が可能な IS-printing system が宮崎大学の林教授らによって開発された[3]．このシステムは腸管出血性大腸菌 O157 の IS 領域を標的としたマルチプレックス PCR であり，東洋紡績㈱からキットとして発売されている．このキットを使用することで，菌株分離後の分子疫学的分析までの時間が大幅に短縮され，迅速に結果を行政部門に提供することが可能であり，疫学調査などにおいて有力な手段となることが期待されている[4,5]．そこで，今回このキットを使って，PFGE と IS-printing system を比較しその有用性について検討したので報告する．

材料及び方法

1．菌株及び供試菌液

北海道で発生のあった腸管出血性大腸菌 O157 菌株について，18 事例 61 株を用いた（表 1）．

これらの菌株を平板培地上で単一コロニーとし，この 1 コロニーを 4 mL の LB-Broth（DIFCO）に接種して 37℃で一夜培養後供試菌液とした．

2．PFGE

供試菌液 1 mL を 1.5 mL マイクロチューブに移し，100 μL のホルマリンを加え撹拌後 30 分間処理した．処理後，遠心分離し沈渣を TE buffer で洗浄し，150 μL の TE buffer に懸濁した後，感染研ニュープロトコールに準拠しプラグ作成，Proteinase K 処理，制限酵素（*Xba* I）処理した．泳動は CHEF DR II（BIO-RAD：条件 6 V/cm，2.2～54.2 sec）で，0.5×TBE buffer（温度 14℃）を使用し 21 時間行った．また，PFGE パターンの解析には Fingerprinting II（BIO-RAD）を使用した．

3．IS-printing system

供試菌液 500 μL を 1.5 mL マイクロチューブに移し遠心分離後，上清を捨て IS-printing system Ver.2（TOYOBO）の取扱説明書に従って処理し，PCR 後電気泳動した．バンドの有無により有る方を 1，無い方を 0 として表を作成しそれぞれの菌株について類似性を比較した．また，IS-printing system のパターンのコード化について検討を行うため，表をもとにして病原性関連遺伝子（hlyA，eae，Stx1，Stx2）と 1st セットの 1～16，2nd セットの 1～16 を 4 バンドごとに 16 進数に変換し，最初に病原性関連遺伝子の 1 文字を付け，1st セットの IS エリア 4 文字，2nd セットの 4 文字の順に記載して各菌株の比較を行った．

結果及び考察

PFGE によるタイプ分け（類似係数：Dice，デンドログラムタイプ：UPGMA，トレランス設定：1.0%，クラスター範囲：90.0～100.0%）の結果，AA～AK までの 11 クラスターに分類された．集団事例では事例 1 がタイプ AA，事例 2 がタイプ AJ，事例 3 がタイプ AD，事例

表１　供試菌株

事例	発生年	菌株番号	血清型	毒素	由来	備考
1	2007	1～5	O157：H7	Stx2	Patient	
2	2006	6～10	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
3	2005	11～18	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
		19～20	O157：H7	Stx1，Stx2	Staff	
		21～30	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
		31～32	O157：H7	Stx1，Stx2	Carrier	
		33～35	O157：H7	Stx1，Stx2	Staff	
		36	O157：H7	Stx1，Stx2	Relatives	
4	1996	38～39	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
5	1996	41～43	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	MUG(＋)
		44	O157：H7	Stx1，Stx2	Swab	MUG(＋)
6	1996	45	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	MUG(＋)
		46	O157：H7	Stx1，Stx2	Carrier	MUG(＋)
7	1996	47	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	MUG(＋)
		48～50	O157：H7	Stx1，Stx2	Carrier	MUG(＋)
8	1998	51～53	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
9	2007	57	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
10	2007	58	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
11	2007	59	O157：H7	Stx1，Stx2	Carrier	
12	2007	60	O157：H7	Stx1，Stx2	Carrier	
13	2007	61	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
14	2007	63	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
15	2007	64	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
16	2007	65	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
17	2007	66	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	
18	2007	67	O157：H7	Stx1，Stx2	Patient	

4 がタイプ AI，事例 5 と事例 6 及び事例 7 がタイプ AK，事例 8 がタイプ AH にそれぞれ分類された．散発事例では事例 11，事例 13，事例 14，事例 15 がタイプ AC に，事例 12，事例 17，事例 18 がタイプ AE に分類され，事例 9 はタイプ AF，事例 10 はタイプ AB，事例 16 はタイプ AG にそれぞれ分類された（図１）．

IS-printing system では，16 パターンに分けられた．集団事例では事例 1 が D-C69BD23A，事例 2 が F-F35F783B，事例 3 が F-D3DF727B，事例 4 が F-19CB4282，事例 5 が 7-10884000，事例 7 が F-93529904，事例 8 が F-93CB447B で事例内菌株はそれぞれ同一のパターンを示したが，事例 6 については F-10929904 と 7-00929904 の異なったパターンとなった．散発事例では，事例 9 が F-F1DEF23B，事例 10 が F-C29B7232，事例 11 と事例 14 が F-D3DF527B，事例 12 と事例 17 が F-D3DF527A，事例 13 が F-729BD23A，事例 16 が F-D3DF727A，事例 18 が F-D3CF727A となった．また，事例 15 が F-D3DF727B となり集団事例 3 と同一のパターンを示した（表２）．

事例別で IS-printing system と PFGE を比較すると（表３），集団事例の事例１，事例２，事例３，事例４，事例８ともに PFGE による分類と，IS-printing system のパターン分けは一致した．また，PFGE の分類でタイプ AK に分類された事例５，事例６，事例７については，IS-printing system では，それぞれ別のパターンを示した．これらのことから IS-printing system によるタイプ分けは，集団事例において有用であると考えられるが，事例６については，事例内２菌株がそれぞれ別のパターンを示し，病原性関連遺伝子 hlyA のバンドの有無と，1st セットの 1-04 のバンドの有無の違いが認められた．本事例の２菌株は，患者由来株と健康保菌者由来株であり，このことがパターンの違いに現れた可能性も示唆されるが，今後さらに検討する必要があると思われた．また散発事例においては PFGE で，事例 11，事例 13，事例 14，事例 15 はタイプ AC に，事例 12，事例 17，事例 18 がタイプ AE に分類されたが，IS-printing system では事例 11 と事例 14，事例 12 と事例 17 はそれぞれ同一のパターンとなり，他はそれぞれ別々のパターンを示した．

また，事例 3 と事例 15 のように，IS-printing system で同一のパターンを示し，PFGE のタイプ分けが異なっ

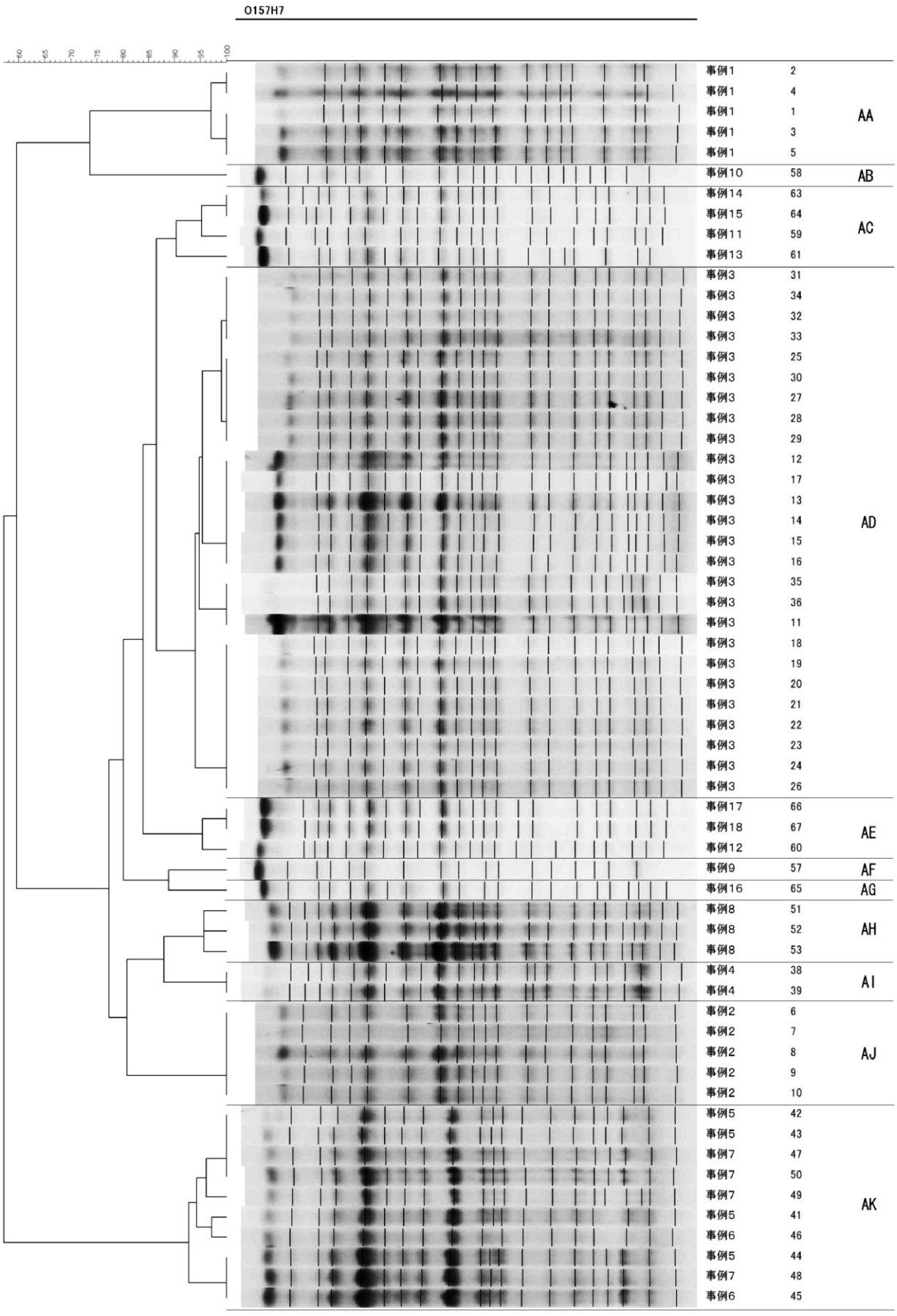
O157H7
60
65
70
75
80
85
90
95
100
事例1 2
事例1 4
事例1 1
事例1 3
事例1 5
AA
事例10 58
AB
事例14 63
事例15 64
事例11 59
事例13 61
AC
事例3 31
事例3 34
事例3 32
事例3 33
事例3 25
事例3 30
事例3 27
事例3 28
事例3 29
事例3 12
事例3 17
事例3 13
事例3 14
事例3 15
事例3 16
事例3 35
事例3 36
事例3 11
事例3 18
事例3 19
事例3 20
事例3 21
事例3 22
事例3 23
事例3 24
事例3 26
AD
事例17 66
事例18 67
事例12 60
AE
事例9 57
AF
事例16 65
AG
事例8 51
事例8 52
事例8 53
AH
事例4 38
事例4 39
AI
事例2 6
事例2 7
事例2 8
事例2 9
事例2 10
AJ
事例5 42
事例5 43
事例7 47
事例7 50
事例7 49
事例5 41
事例6 46
事例5 44
事例7 48
事例6 45
AK

図1　デンドログラム

表2　IS-printing system の結果

事例	番号	1st set																		2nd set																IS コード
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	
1	1～5	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	D-C69BD23A
2	6～10	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	F-F35F783B
3	11～36	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	F-D3DF727B
4	38～39	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	F-19CB4282
5	41～44	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7-10884000
6	45	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	F-10929904
	46	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	7-00929904
7	47～50	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	F-93529904
8	51～53	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	F-93CB447B
9	57	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	F-F1DEF23B
10	58	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	F-C29B7232
11	59	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	F-D3DF527B
12	60	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	F-D3DF527A
13	61	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	F-729BD23A
14	63	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	F-D3DF527B
15	64	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	F-D3DF727B
16	65	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	F-D3DF727A
17	66	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	F-D3DF527A
18	67	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	F-D3CF727A

表3　PFGE タイプと IS コード

事例	番号	IS コード	PFGE
1	1～5	D-C69BD23A	AA
2	6～10	F-F35F783B	AJ
3	11～36	F-D3DF727B	AD
4	38～39	F-19CB4282	AI
5	41～42	7-10884000	AK
6	45	F-10929904	AK
	46	7-00929904	AK
7	47～50	F-93529904	AK
8	51～53	F-93CB447B	AH
9	57	F-F1DEF23B	AF
10	58	F-C29B7232	AB
11	59	F-D3DF527B	AC
12	60	F-D3DF527A	AE
13	61	F-729BD23A	AC
14	63	F-D3DF527B	AC
15	64	F-D3DF727B	AC
16	65	F-D3DF727A	AG
17	66	F-D3DF527A	AE
18	67	F-D3CF727A	AE

たものもあり，散発事例については，さらに事例を集め検討する必要があると思われた．

IS-printing system のデータは，1st セット 18 本，2nd セット 18 本の計 36 本のバンドをその有無により 1 と 0 に置き換えて比較する．この場合，少ない菌株数であれば，相違の確認も容易にできるが，菌株数が増えてくると相違の確認に手間取ってしまうばかりか，見落としなどの危険性も出てくる．今回，独自に IS-printing system のデータをコード化し比較検討を行ったが，コード化することでデータを簡素化でき，また，比較検討が容易となった．今回のデータのコード化で用いた 16 進数は，0～9 と A～F を使って表記するコンピュータなどのデジタルデータを効率よく数値化するときに用いられるものである．IS-printing system では，1st セット，2nd セットの IS エリアがそれぞれ 16 本のバンドで構成され，さらに病原性関連遺伝子が 4 本のバンドで構成されているため，これらを 4 本ずつまとめ，16 進数へ変換することで効率よくコード化することができた．また，病原性関連遺伝子の欠落や，1st セット，2nd セットのどのバンドが有り，どのバンドが無いかなどをコードから判断できることから，単に数値化したものよりも有益であった．しかし，16 進数については，一般にあまりなじみが無いことから，10 進数を用いたコード化についても検討する必要があると思われた．

稿を終えるに当たり，本研究は平成 18～20 年度厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」の一環として実施したものであることを付記する．

文　　献

1）小笠原準：生活衛生，**50**，378-380（2006）
2）寺嶋　淳：日本食品微生物学会雑誌，**24**，74-79（2007）
3）大岡唯祐，小椋義俊，中山恵介，黒川　顕，寺嶋　淳，渡辺治雄，林　哲也：日本細菌学雑誌，**61**，127（2006）
4）金子紀子，大谷勝実，青木敏也：山形衛研所報，**41**，29-31（2008）
5）末永朱美，国寄勝也，蔵田和正，石村勝之，伊藤文明，笠間良雄：広島市衛研年報，**27**，74-76（2008）